

# ЛОКАЛЬНАЯ ЛИМФОЦИТАРНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КРОВЕТВОРНОЙ ТКАНИ ОБЛУЧЕННЫХ РЕЦИПИЕНТОВ МИЕЛОТРАНСПЛАНТАТА НА УРОВНЕ ИХ КОСТНОГО МОЗГА

Н.Н. Попов<sup>1</sup>, Е.А. Романова<sup>2</sup>, С.Б. Лавелин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина

<sup>2</sup>Институт микробиологии и иммунологии имени И.И. Мечникова АМН Украины, г. Харьков

## РЕЗЮМЕ

После тотального облучения в дозе 9 Гр мышей линии (СВАхС57ВL)F1 и последующей сингенной миело- и лимфомиелотрансплантации на 30-е сутки исследования отмечена высокая супрессия лимфоцитами костного мозга реципиентов пролиферации стимулированных спленоцитов *in vitro*. Более выраженная супрессорная активность наблюдалась у лимфоцитов реципиентов лимфомиелотрансплантата по сравнению с клетками животных, получавших миелокариоциты *per se*. Фенотипическое исследование Т-истощенной фракции лимфоцитов костного мозга обнаружило, что супрессорными свойствами обладают клетки фенотипа ноль-лимфоцитов и клетки, экспрессирующие sIg-молекулы.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** трансплантация, костный мозг, лимфоциты, регуляция

Трансплантация костного мозга является эффективным способом лечения гипо- и аплазий кроветворной ткани, тяжелых иммунодефицитных состояний, лимфо- и миелопролиферативных заболеваний [1, 2]. Однако, экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о том, что наиболее значимой в период ранней послетрансплантационной реконституции предстает проблема ее задержки для лимфомиелоидных органов, следствием чего часто становятся инфекционные и неинфекционные осложнения, способные в ряде случаев приводить к фатальному исходу [3, 4]. Принимая во внимание участие лимфоцитов в процессах гемопоэза, пролиферации и дифференцировки кроветворных предшественников [5], а также в процессах репаративной регенерации разнообразных тканей [6], особый интерес представляет усовершенствование трансплантата костномозговых клеток путем обогащения его лимфоидными клетками с целью повышения эффективности для восстановления гематологического и иммунного статуса реципиентов с дефицитом кроветворения.

Первостепенную значимость для оценки полноценности восстановления костного мозга у реципиентов такого комбинированного трансплантата приобретает определение локальных механизмов, контролирующих и регулирующих процессы реконституции гемопоэтической ткани на уровне стволовых кроветворных клеток и их миелоидных и лимфоидных потомков, что и явилось целью настоящей работы.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены на самцах мышей линии {СВАхС57ВL}F<sub>1</sub> 6-10 – недельного возраста, массой 20-22 г. Живот-

ных подвергали тотальному рентгеновскому облучению в дозе 9 Гр с помощью установки РУМ-17. Через 6-8 часов после облучения животным 1-й группы проводили сингенную трансплантацию, внутривенно вводя 5х10<sup>6</sup> костномозговых клеток на мышшь; животным 2-й группы – 5х10<sup>6</sup> клеток костного мозга совместно с 20х10<sup>6</sup> тимоцитов на мышшь внутривенно в одном шприце. Контрольной группой служили интактные животные той же линии, возраста, пола и веса, что и в двух опытных группах. Для определения каждого показателя от каждой группы было использовано по 20 животных.

Супрессорную активность лимфоцитов костного мозга и их отдельных популяций у облученных животных, защищенных миелокариоцитами *per se* и лимфомиелотрансплантатом, определяли по коэффициенту супрессии (Ks) стимулированных ЛПС ("Sigma") и ФГА ("Difko") нормальных мышшиных клеток селезенки на модели Атауллаханова [7].

Чистую популяцию sIg<sup>+</sup> и ноль-клеток из суспензии Т-истощенных лимфоцитов костного мозга получали методом пеннинга на чашках Петри, нагруженных IgG-фракцией антииммуноглобулиновой сыворотки [8]. Популяции FcR<sup>+</sup> и C3R<sup>+</sup> клеток получали методами ЕА- и ЕАС-розеткообразования [9, 10] с дальнейшим седиментационным разделением клеток в градиенте плотности 1,096 фикола-верографина. Лизис эритроцитов проводили в 0,83%-ом растворе NH<sub>4</sub>Cl в трис-буфере.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel 97.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение функциональной активности

лимфоцитов костного мозга показало, что с 20-х суток в бедренной кости облученных реципиентов как лимфомиелотрансплантата, так и миелотрансплантата, появляются лимфоциты, супрессирующие включение  $^3\text{H}$ -тимидина в стимулированные ФГА и ЛПС сингенные клетки селезенки нормальных (интактных) мышей. В этот период супрессорная активность лимфоцитов облученных реципиентов как 1-й, так и 2-й групп достигает уровня значений, присущего клеткам нормального костного мозга, а с 30-х пострадиационных суток превышает его в 1,3-1,8 раз до конца третьего месяца исследования – в 1-й и до конца второго – во 2-й группе (табл. 1, 2).

Таблица 1

**Коэффициент супрессии (Ks) включения  $^3\text{H}$ -тимидина в стимулированные ЛПС клетки селезенки нормальных мышей лимфоцитами бедренной кости облученных реципиентов миелотрансплантата (1) и лимфомиелотрансплантата (2) ( $M \pm m$ )**

Сутки после облучения и трансплантации	1	2
10	0,95±0,05*	0,96±0,05*
15	1,0±0,05*	1,2±0,05***
20	2,0±0,10	2,2±0,11
30	3,0±0,20"	4,0±0,22*""
45	3,0±0,18"	3,7±0,20*""
60	2,8±0,18*	2,5±0,14*
90	2,7±0,14*	2,2±0,12

1. Супрессорная активность (Ks) лимфоцитов костного мозга нормальных животных по отношению к нормальным клеткам селезенки, стимулированным ЛПС, составляет 2,0±0,10 отн.ед.

2. \*-достоверность отличий по сравнению с нормой ( $p < 0,05$ );

\*\*\* - достоверность отличий показателей животных группы 2 по сравнению с показателями животных группы 1 ( $p < 0,05$ ).

Таблица 2

**Коэффициент супрессии (Ks) включения  $^3\text{H}$ -тимидина в стимулированные ФГА клетки селезенки нормальных животных лимфоцитами бедренной кости облученных реципиентов миелотрансплантата (1) и лимфомиелотрансплантата (2) ( $M \pm m$ )**

Сутки после облучения и трансплантации	1	2
10	0,96±0,05*	0,96±0,05*
15	1,2±0,06*	1,4±0,06*""
20	2,2±0,11	2,7±0,13"
30	3,6±0,22*	4,4±0,24***
45	3,2±0,18*	4,0±0,20*""
60	3,2±0,20*	3,0±0,17*
90	3,1±0,15	2,5±0,13"

1. Супрессорная активность (Ks) лимфоцитов костного мозга нормальных животных по отношению к нормальным клеткам селезенки, стимулированным ФГА, составляет 2,4 ± 1,3 отн.ед.

2. \*-достоверность отличий по сравнению с нормой ( $p < 0,05$ );

\*\*\* - достоверность отличий показателей животных группы 2 по сравнению с показателями животных группы 1 ( $p < 0,05$ ).

Из полученных нами данных следует, что до 60-х суток более выразительная супрессорная активность лимфоцитов отмечается у

животных, получивших комбинированный трансплантат, по сравнению с реципиентами миелокарицитов *per se*. Однако, на протяжении третьего месяца после облучения и трансплантации у реципиентов 2-й группы эта активность угасает, тогда как у мышей 1-й группы она остается достоверно повышенной до конца периода исследования (90-х суток). По отношению непродлиферирующих клеток лимфоциты костного мозга реципиентов ингибирующего действия не оказывали.

Фенотипическое изучение супрессорных клеток облученных реципиентов 1-й и 2-й групп было проведено на начальных этапах их активности – на 30-е сутки после облучения и трансплантации и в конце периода исследования – на 60-е сутки. В эти периоды из суспензии лимфоцитов костного мозга и селезенки реципиентов были выделены отдельные популяции  $\text{sIg}^+$ ,  $\text{FcR}^+$ ,  $\text{C}_3\text{R}^+$  и ноль-клеток. Было обнаружено, что в лимфоидном пуле клеток костного мозга у животных как 1-й, так и 2-й групп на протяжении обоих периодов исследования основное супрессорное действие производят ноль-лимфоциты и  $\text{sIg}^+$ -клетки.

Очевидно, что простое суммирование супрессорной активности этих двух популяций лимфоцитов составляет несколько более высокую величину, чем величина супрессорной активности (Kб) общей популяции Т-истощенных клеток костного мозга. У обеих групп животных ноль-клетки костного мозга обладают более высокой супрессорной активностью по сравнению с  $\text{sIg}^+$ -клетками. Нами также установлено, что в 1-й и 2-й группах животных супрессорными свойствами обладают  $\text{FcR}^+$ -клетки, а  $\text{C}_3\text{R}^+$ -клетки подобных свойств не обнаруживают. Таким образом, очевидно, на ноль- и  $\text{sIg}^+$ -клетках, оказывающих супрессорное действие, экспрессируются Рс-рецепторы. Для популяции костномозговых клеток интактных мышей характерно проявление супрессорной активности ноль-лимфоцитами и в незначительной степени –  $\text{sIg}^+$ -клетками.

Фенотипический анализ показал, что по поверхностным характеристикам супрессорные клетки костного мозга, полученные на 30-е и 60-е сутки после облучения и трансплантации, мало отличаются от супрессорных клеток интактного костного мозга.

Анализ содержания и функциональной активности ноль-лимфоцитов костного мозга в разные сроки после облучения и трансплантации клеток показал, что ноль-лимфоциты ранних сроков главным образом представлены популяцией незрелых лимфоцитов, а неспецифические супрессорные клетки,

формирующиеся с 30-х суток, являются особой клеточной популяцией. Можно предположить, что на этом этапе неспецифическое супрессорное действие лимфоцитов костного мозга опосредуется популяцией зернистых лимфоцитов, не имеющих маркеров Т-или В-лимфоцитов. Установлено, что клетки этого типа хорошо переносят облучение и после него способны активно репопулировать лимфоидную ткань. Вероятно, что увеличение количества и/или активности ноль-клеток с супрессорными свойствами в костном мозге связано с интенсивностью гемо- и лимфопоэза в органе в начальный посттрансплантационный период, а также является результатом активного взаимодействия клеток донорского и хозяйского типов на этапе становления клеточности костного мозга.

Полученные нами данные об индукции супрессорных клеток в костном мозге животных после облучения и миелотрансплантации свидетельствуют о механизме активной супрессии иммуногенеза у сингенных радиационных химер. Результаты этих исследований могут служить одним из возможных объяснений продолжительной депрессии антителообразующей способности у облученных животных, защищенных костным мозгом, которая на протяжении второго пострадиационного месяца составляет 60-70% по сравнению с показателями интактных животных, а также сниженной, по сравнению с нормой, бластогенной реакцией лимфоцитов на митогены.

Повышенная активность супрессорных клеток в костном мозге может также подавлять продукцию *in situ* прекурсоров АОК и оказывать супрессирующее влияние на все активно пролиферирующие клетки.

Активное влияние супрессорных клеток на гемопоэз может также служить причиной волнообразного характера восстановления клеточности в костном мозге облученных реципиентов, защищенных миелотрансплантатом.

Следует отметить, что супрессорная активность лимфоцитов костного мозга реципиентов комбинированного лимфомиелотрансплантата, являясь более выраженной на первых этапах появления этих клеток (второй посттрансплантационный месяц), в дальнейшем снижается, полностью нормализуясь к 90-м суткам. Это может свидетельствовать о регулирующей способности введенных тимоцитов в отношении супрессорного эффекта, оказываемого лимфоцитами костного мозга на пролиферирующие клетки. Благодаря влиянию введенных Т-клеток, это действие костномозговых лимфоцитов

постепенно нивелируется по мере восстановления клеточности органа. Возможно, в данном случае срабатывает механизм ограничения перепроизводства клеток в восстанавливаемом органе, обеспечивая постепенный, линейный характер реконституции миелокарицитов у реципиентов комбинированного лимфомиелотрансплантата.

## ВЫВОДЫ

1. Реконституция костного мозга летально облученных реципиентов лимфомиелотрансплантата, как и миелотрансплантата, сопровождается появлением среди миелокарицитов супрессорных клеток, имеющих фенотипы ноль- и sIg<sup>+</sup>-лимфоцитов и экспрессирующих Fc-рецепторы.
2. У реципиентов лимфомиелотрансплантата супрессорные клетки проявляют повышенную активность с 20-х по 60-е пострадиационные сутки, тогда как при трансфузии миелокарицитов *per se* она продолжает регистрироваться до 90-х суток.
3. Супрессорные клетки костного мозга облученных реципиентов миело- и лимфомиелотрансплантата оказывают влияние только на стимулированные, активно пролиферирующие клетки.

Учитывая, что регуляция гемо- и лимфопоэза в организме осуществляется как путем непосредственного клеточного взаимодействия, так и посредством факторов, содержащихся в сыворотке, предметом дальнейших исследований механизмов, контролирующих восстановление гемопоэза облученных реципиентов лимфомиелотрансплантата, на наш взгляд, должно стать модулирующее влияние сыворотки на реконституцию костного мозга, а также природа сывороточных компонентов, производящих подобное действие.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Collins R.N. // Lancet. - 1997. - № 9050. - P. 881-887.
2. Donall T.E. // Brit. J. Haematol. - 1999. - № 2. - P. 330-339.
3. Лисуков И.А., Крючкова И.В., Кулагин А.Д., и др. // Терапевт. арх. - 1998. - №7. - С. 78-79.
4. Carreras E., Bertz H., Arcese W., et. Al. // Blood. - 1998. - № 10. - P. 3599-3604.
5. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М. Роль лимфоцитов в регуляции гемопоэза. -Томск. - 1983. - 189 с.
6. Бабаева А.Г. Регенерация и система иммуногенеза. -М.:Наука. -1985. - 212 с.
7. Атауллаханов Р.И., Хайтов Р.М., Сидорович Г.Г., и др.//Цитология.- 1980.- Т.22.- №8. - С. 966-970.
8. Mage M.G., McHugh L.L., Rothstein NX. // Immunol. Meth. - 1977. - Vol. 15. - № 1. - P. 47-56.
9. Lyndsten T., Andersson B. // Cell Immunol, - 1981. - Vol. 61. - № 2. - P. 386-396.
10. Miyama M., Kuribayashi K., Yodai J. // Cell. Immunol. - 1978. - Vol. 35. - № 2. - P. 253-265.